

## Nuevos microorganismos para la reducción de cetonas en condiciones sostenibles: *Monascus kaoliang* y *Diplogelasinospora grovesii*

José A. Cruz Monzón<sup>1</sup>, Jorge Mendoza Bobadilla<sup>1</sup>, Alberto Quezada Álvarez<sup>2</sup>, Noé Costilla Sánchez<sup>3</sup>, José Sinisterra Gago<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, UNT, Perú; [jcruzmon@unitru.edu.pe](mailto:jcruzmon@unitru.edu.pe); [jmb76@hotmail.com](mailto:jmb76@hotmail.com)

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Química, UNT, Perú; [maqa69@hotmail.com](mailto:maqa69@hotmail.com)

<sup>3</sup>Departamento de Química, UNT, Perú; [costilla\\_noe@hotmail.com](mailto:costilla_noe@hotmail.com)

<sup>4</sup>Universidad Complutense de Madrid, España; [jvsgago@farm.ucm.es](mailto:jvsgago@farm.ucm.es)

Recibido: 02-08-13

Aceptado: 29-09-13

### RESUMEN

En el presente trabajo se investigó la capacidad reductora de los microorganismos ascomicetos *Monascus kaoliang* CBS 302.78 y *Diplogelasinospora grovesii* IMI 171018 a condiciones sostenibles con la finalidad de obtener un método alternativo de sustitución de los catalizadores tradicionales basados en metales y boranos, los cuales generan bajas productividades y contaminación debido a los subproductos. Los microorganismos fueron cultivados en medio Hags. Los ensayos se realizaron empleando un equipo de cromatografía Líquida de Alta Eficiencia HPLC. Al utilizar el microorganismo *Monascus kaoliang* en sustrato de acetofenona a concentraciones alrededor de 10.4 mM se obtuvo una conversión del 58% y una productividad de  $3.2 \times 10^{-4}$  mM/g cat\*h mientras que la *Diplogelasinospora grovesii*, en sustrato acetofenona a concentraciones alrededor a 7.2 mM, permitió una conversión del 54% con una productividad de  $3.6 \times 10^{-4}$  mM/g cat\*h. En base a los resultados podemos concluir que ambos microorganismos son una alternativa para lograr la reducción de cetonas a condiciones sostenibles, pues suceden a condiciones casi ambientales y en medios acuosos. Asimismo, que la reducción de la acetofenona tuvo lugar en la fase estacionaria de crecimiento de los ascomicetos (después de 7 días de crecimiento), y que la cinética de reacción es de pseudo primer orden con una velocidad específica de consumo del sustrato que es aproximadamente diez veces mayor que la velocidad específica de obtención del producto 1-feniletanol.

**Palabras clave:** biocatálisis, biotransformación, acetofenona, *Monascus kaoliang*, *Diplogelasinospora grovesii*.

### ABSTRACT

In this research work it was investigated the reducing capacity of the microorganisms ascomycetes *Monascus kaoliang* CBS 302.78 and *Diplogelasinospora grovesii* IMI 171018 under sustainable conditions, in order to obtain an alternative method that would allow to replace traditional catalysts based on metals and boranes which generate low productivity and pollution due to the subproducts. The microorganisms were cultivated in Hags media. The tests were carried out by using a high efficiency liquid chromatography HPLC. The use of the microorganism *Monascus kaoliang* in acetophenone substrate to about 10.4 mM concentrations produced a conversion of 58% and a productivity of  $3.2 \times 10^{-4}$  mM / g cat \* h while the *Diplogelasinospora grovesii* in substrate acetophenone at concentrations around 7.2 mM, allowed a conversion of 54% with a productivity of  $3.6 \times 10^{-4}$  mM / g cat \* h. Based on this results we conclude that both microorganisms are a good alternative to achieve the reduction of ketones to sustainable conditions, this happening almost at environmental conditions and in aqueous media. Likewise, the reduction of acetophenone took place in the stationary growth phase of the ascomycetes (after 7 days of growth), and the reaction kinetics is of a pseudo first order with a specific speed of substrate consumption of about ten times greater than the specific speed of the obtention of the product 1-phenylethanol.

**Keywords:** Biocatalysis; Biotransformations, acetophenone, *Monascus kaoliang*, *Diplogelasinospora grovesii*.

## I. INTRODUCCIÓN

Aunque nuestra sociedad occidental demanda cada vez una mayor cantidad de productos químicos, la percepción que se tiene de lo químico es cada vez más negativa. Es cierto que el sector químico ha tenido un elevado crecimiento en la producción de compuestos demandados por una sociedad cada vez más depredadora de bienes de consumo, y según las previsiones, éste crecimiento continuará en el futuro. Si bien es cierto que la presión incrementa la actividad productiva, lo es también la actividad contaminante y generadora de residuos molestos, dando lugar a una imagen negativa de todo aquello que se relaciona con la química (Domènech, 2005: 1).

En ese sentido, desarrollar procesos en el campo de la Química Sostenible ("Green Chemistry & Engineering") hoy en día juega un rol muy importante toda vez que utiliza un conjunto de principios que reducen o eliminan el uso y generación de sustancias peligrosas en el diseño, manufactura y aplicación de los productos químicos, manteniendo la calidad del producto final y la rentabilidad económica del proceso.

Esto lleva implícito alcanzar un proceso que sea inocuo en si mismo y respetuoso con el medio ambiente (Quezada, 2006: 6).

A lo largo de los últimos años, la demanda de compuestos enantiopuros ha crecido de forma sustancial, principalmente dentro del ámbito de las industrias de aromas y agroquímica, y de forma aún más destacada en la industria farmacéutica (Nuñez et al, 2009; Davies y Welch, 2009). En ese sentido, la reducción estereoselectiva de un carbonilo proquiral ( $C=O$ ) en un alcohol que posee un centro estereogénico ( $*CH-OH$ ) es un proceso de gran importancia dentro del ámbito de la síntesis asimétrica, puesto que supone un proceso directo que transcurre con gran economía atómica para la obtención de alcoholes enantioméricamente puros (Sheldon, 2000).

En el 2002, la producción de alcoholes quirales supuso unas ventas de 7 billones de dólares, estimándose un aumento de hasta 14,9 billones para el 2009 (Parachin y cols, 2010). Actualmente, se ha superado dichas expectativas. Debido a la enorme importancia de este tipo de compuestos en la síntesis de moléculas bioactivas, la reducción estereo selectiva de cetonas ha adquirido un enorme interés industrial, y en ese sentido, se han descrito numerosas rutas catalíticas; así, la hidrogenación asimétrica de cetonas catalizada por metales (Nayori, 2002) o el empleo de boranos (Ma y Cahard, 2004; Burkhardt y Matos, 2006) constituyen procesos que han sido descritos de manera eficiente a escala industrial. No obstante, se suelen precisar condiciones poco compatibles con la Química Sostenible (Anastas y Warner; 1998; Anastas, 2002; Tucker, 2010; Anastas, 2010; Anastas y Eghbali, 2010) puesto que en dichos procesos suelen utilizarse temperaturas elevadas, disolventes y/o reactivos tóxicos.

De forma complementaria a estos procesos quimio catalíticos, la reducción de cetonas empleando biocatalizadores constituye una alternativa muy eficiente y atractiva que opera a condiciones de pH y temperatura mucho más suaves. La ventaja de las reacciones biocatalíticas sobre las reacciones químicas tradicionales consiste en que aquellas son estereo selectivas y pueden realizarse a presión atmosférica y temperatura ambiente. Dado que muchos procesos biocatalíticos se pueden llevar a cabo en medio acuoso u orgánico/acuoso empleando disolventes poco tóxicos, justifica que la biocatálisis sea una de las líneas fundamentales en el desarrollo de la Química Sostenible. Además, las enzimas y células microbianas se pueden inmovilizar y reutilizar lo cual rebaja los costes de producción (Faber y Kroutil, 2005; Faber, 2004).

Asimismo, en la reacción de reducción de un compuesto carbonílico hasta el correspondiente alcohol se consume un equivalente de coenzima ( $NAD(P)H$ ) por cada equivalente de sustrato convertido, generando un equivalente de coenzima oxidada ( $NAD(P)^+$ ). Debido a este hecho, cuando se emplean enzimas aisladas es necesario desarrollar un sistema de regeneración de la coenzima, pues de otra manera el proceso sería económicamente muy desfavorable. Por ello, no es de extrañar que aproximadamente un 75% de los procesos de biorreducciones industriales empleen células enteras, pues el microorganismo posee la maquinaria metabólica requerida para la regeneración de la coenzima (Nayori, 2002).

No obstante, el hecho de que existan muchas colecciones de microorganismos comercialmente disponibles (ATTC, NCTC, DSMZ o CCUG) (Drauz y Waldmann, 2002), constituye una gran ventaja respecto al empleo de enzimas aisladas, puesto que el número de las mismas al cual se puede acceder comercialmente es mucho más limitado (Hiroaki, 2010; Gröger et al, 2010).

Por otra parte, las células enteras pueden ser utilizadas en procesos de biorreducción en diferentes estados fisiológicos (Presecki et al, 2006): en reposo (Martines et al, 2000), crecimiento (Carballeira et al, 2004), permeabilizadas (Zhang et al, 2009) o liofilizadas (Hoyos et al, 2008) siendo el primer tipo el más frecuente.

Los procesos industriales basados en procesos biotecnológicos suelen ser altamente sostenibles. Así lo reconoce la, Organisation for Economic Cooperation and Development, (OECD), en sus publicaciones como la ya clásica "*Biotechnology for clean industrial products & process: towards industrial sustainability*" de 1998, donde hace notar que la biotecnología es una herramienta poderosa para alcanzar el desarrollo industrial sostenible. Además, el moderno desarrollo de los procesos busca hacerlos mediante intensificación de los mismos y siguiendo las metodologías y conceptos emanados de la filosofía del desarrollo sostenible (Curzons et al, 2001). Esta nueva manera de desarrollar los procesos biotecnológicos industriales es la que recibe el nombre de Biotecnología Blanca (Jenck et al, 2004).

En ese sentido, el presente artículo pretende contribuir a eco-diseñar las biorreducciones en condiciones sostenibles (medios acuosos, temperatura ambiente y presión atmosférica) empleando microorganismos con el cosustrato adecuado para la regeneración del cofactor y utilizando equipos cualificados y métodos validados de análisis. Los microorganismos de la colección de partida y los medios de cultivo empleados en el presente trabajo de investigación fue propuesto por el Centro de Investigación Básica de Galxo-SmithKline (GSK) abarcando microorganismos de diferentes grupos taxonómicos (Carballeira, 2003).

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 OBJETO DE ESTUDIO

El objeto de estudio estuvo constituido por los microorganismos (*Monascus kaoliang* y *Diplogelasma grovesii*) empleados en condiciones casi ambientales y en medios acuosos para los procesos de reacciones de reducción de cetonas tomándose como reacción test la reducción de la acetofenona.

Las cepas microbianas fueron proporcionadas por la empresa Glaxo Smith Klane. Los medios de cultivo fueron adquiridos en Merck y Difco y el sustrato acetofenona en Sigma-Aldrich.

Las variables estudiadas fueron la conversión, rendimiento, productividad y parámetros cinéticos de la reacción test, para lo cual se tomaron muestras de biomasa de *M. kaoliang* y de *D. grovesii* respectivamente.

### 2.2 EQUIPOS E INSTRUMENTOS

Se evaluó el grado de conversión de la acetofenona en 1-feniletanol vía análisis a diferentes tiempos utilizando la cromatografía líquida de alta eficiencia y usando el método de estándares externos.

Todos los ensayos cromatográficos se realizaron empleando un equipo de cromatografía Líquida de Alta Eficiencia HPLC marca Agilent 1100 series, con las siguientes condiciones cromatográficas:

Fase móvil	: Metanol – Agua (45: 55 v/v)
Flujo	: 1 mL / min
Volumen de Inyección	: 10 µL

Longitud de onda : 217,4 nm (detector de arreglo de diodos (DAD))  
Temperatura Termostato : 30 °C  
Columna : Teknokroma Mediterránea Sea C18  
(5  $\mu$ m\*15cm\*0,46cm)

## 2.3 MÉTODOS Y TÉCNICAS

### *Condiciones de crecimiento*

Los microorganismos fueron cultivados en medio HAGGS: (ajustado a pH=6,5) Glicina 2 g/L; extracto de soya 6 g/L; almidón 20 g/L; solución de elementos traza 1 mL/L. Solución traza: FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g/L; MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 1 g/L; CuCl<sub>2</sub> 0.025 g/L; CaCl<sub>2</sub> 0.10 g/L; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.056 g/L; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.019 g/L.

### *Reacción de reducción*

Los microorganismos se cultivaron en matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo a 28 °C y 250 rpm en un equipo de agitación orbital tipo estufa. Después de 7 días de crecimiento se transfirió a un tubo falcon de 15 mL y se centrifugó a 4000 rpm en una centrifuga de rotor angular 8x EBA 20, durante 15 min. El sobrenadante de la centrifugación se desechó y la biomasa se lavó 3 veces con 50 mL de tampón fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 50 mM, pH=6,5. Luego la biomasa se re-suspendió en unos 30 mL del mismo tampón en un matraz de 250 mL, se añadió un volumen determinado de sustrato acetofenona y 0,50 g de glucosa como regenerador del cofactor, de tal manera que al aforar a 50 mL con la solución tampón de fosfato se tiene la concentración inicial utilizada de acetofenona. Finalmente el matraz de reacción se agitó a 28 °C y 250 rpm en un agitador orbital de temperatura controlada.

### *Obtención de datos experimentales*

Se tomaron alícuotas de 500  $\mu$ L de muestras a diferentes tiempos para ser analizadas por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, HPLC, fase reversa y a las condiciones cromatográficas descritas, considerando 03 replicas por cada lectura realizada. Los datos experimentales obtenidos para la cinética de reacción fueron evaluados usando el programa EXFIT del paquete estadístico SIMFIT W.G. Bardsley W. G. Bardsley, University of Manchester, U.K, Windows V5.5 Académica 2005.

## III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *3.1 "Screening" Taxonómico*

Una vez constituida la colección de partida conformada por 9 microorganismos (3 bacterias, 3 levaduras y 3 hongos filamentosos) y determinados los medios de cultivo adecuados para el crecimiento de los microorganismos, se dio inicio al proceso de selección o "screening" taxonómico. Se seleccionó como reacción test (para evaluar la actividad reductasa de cada uno de los microorganismos), la reducción de la acetofenona, por ser una reacción sencilla que puede ser analizada por HPLC para poder tener un criterio cuantitativo de las actividades que presentan nuestros microorganismos. El objetivo de este "screening" fue determinar qué microorganismos eran capaces de catalizar la biotransformación de nuestro sustrato (acetofenona) sin que aparecieran reacciones secundarias. En la **Tabla 01** se muestran los resultados del "screening" con los microorganismos de la colección de partida.

**Tabla 01.** "Screening" de microorganismos de la colección de partida

Grupo	Microorganismo	Código	Conversión (%)
Bacteria	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	DSMZ 11097	5
Bacteria	<i>Ralstonia eutropha</i>	DSMZ 2839	8
Bacteria	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	DSMZ 8424	10
Levadura	<i>Williopsis saturnus</i>	NCYC 2313	12
Levadura	<i>Williopsis californica</i>	CBS 2158	16
Levadura	<i>Pachysolen tannophilus</i>	NCYC 1597	13
Ascomiceto	<i>Coniochaeta velutina</i>	CBS 981.68	40
Ascomiceto	<i>Monascus kaoliang</i>	CBS 302.78	70
Ascomiceto	<i>Diplogelasma grovesii</i>	IMI 171018	50

De la tabla 01 se deduce que de la colección estudiada, los hongos filamentosos son el grupo taxonómico que presentan mayor actividad reductasa mientras que las bacterias y levaduras son poco activos frente a la reacción test propuesta. En biotransformaciones catalizadas por células enteras la principal limitación está dado por el crecimiento no reproducible de la biomasa.

Así, para comprobar la reproducibilidad de los resultados obtenidos y evitar seleccionar biocatalizadores con comportamientos poco reproducibles, se llevó a cabo la reacción test por triplicado con los microorganismos que presentan la mejor actividad reductasa.

De la **Tabla 02** se deduce que los resultados obtenidos con el microorganismo *Coniochaeta velutina* son poco reproducibles al presentar resultados muy dispersos de conversión como lo demuestra el elevado valor del coeficiente de variación (%CV=13,8). La reproducibilidad de los datos mejoran con *Monascus kaoliang* y *Diplogelasma grovesii* al obtenerse mejores conversiones de sustrato (X=70% y 50%, respectivamente) con bajos coeficientes de variación (%CV<2%), razón por la cual se escogieron estos dos últimos microorganismos para realizar el estudio cinético de la reducción de la acetofenona. Se comparó además éste comportamiento con el descrito por Carballeira 2003 y se observó que es coincidente con lo encontrado en la reducción de acetofenonas hidrofóbicas.

**Tabla 02.** Reproducibilidad del "screening"

Grupo	Microorganismo	Conversión (%)				s	%CV
		1º	2º	3º	X		
Ascomiceto	<i>Coniochaeta velutina</i>	25	30	33	29	4,04	13,8
Ascomiceto	<i>Monascus kaoliang</i>	70	69	71	70	1,00	1,4
Ascomiceto	<i>Diplogelasma grovesii</i>	51	50	51	51	1,00	1,1

X = conversión promedio; s = desviación estándar; %CV = coeficiente de variación.

### 3.2 Estudio Cinético

Cuando se llevan a cabo reacciones con microorganismos, no todas las moléculas del sustrato se encuentran disponibles para conversión inmediata; la reacción tiene lugar únicamente después que el sustrato ha sido transportado al lugar de reacción, por lo que los procesos de transferencia de materia pueden ejercer una gran influencia sobre la velocidad global de conversión. Cada célula responde a la concentración de sustrato según su posición con una velocidad de reacción determinada por los parámetros cinéticos del biocatalizador. La velocidad local de reacción se denomina *velocidad verdadera* o *velocidad intrínseca*; las cuales son difíciles de medir en microorganismos. Sin embargo, es posible, medir la *velocidad global* de reacción para el catalizador entero. En un sistema cerrado, la velocidad de desaparición de sustrato en el seno del líquido debe ser igual a la velocidad global de conversión por reacción, hecho que en los sistemas heterogéneos se denomina *velocidad observada*.

Cuando los niveles de sustrato cambian lentamente durante la reacción, los datos de velocidad observada pueden obtenerse recogiendo muestras de la mezcla de reacción a diferentes tiempos y

analizando la variación de la concentración de sustrato. A modo de ejemplo se muestra en la siguiente tabla la disminución de la concentración inicial de sustrato acetofenona (7.21 mM).

En la **Tabla 03**, se puede observar que las áreas del sustrato en los cromatogramas presentan poca dispersión como lo demuestran los bajos valores de la desviación estándar y del coeficiente de variación, lo que da solidez al valor promedio tomado para la determinación de la disminución de la concentración de la acetofenona en función del tiempo de reacción. Resultados similares fueron obtenidos con el microorganismo *Monascus kaoliang*. Para observar mejor los resultados obtenidos, en la figura 1 se muestra la cinética de consumo del sustrato acetofenona catalizada por *D. grovesii*.

En la **Fig. 01** se puede observar que los resultados experimentales tienen una tendencia de decaimiento exponencial, lo cual es coincidente con la misma tendencia expuesta por Fernández, Lucas y Col (2008); razón por la cual todos los ensayos de consumo de sustrato para ambos microorganismos fueron ajustados con el programa EXFIT del paquete estadístico SIMFIT v5.5 ed. 18 a un modelo de decaimiento exponencial de la forma:

$$f(t) = [A \cdot e^{-K \cdot t}] + C$$

Donde:

K = Constante aparente de velocidad de consumo de sustrato. ( $h^{-1}$ )

C = Valor asintótico cuando el tiempo decrece indefinidamente. (mM)

A = Gradiente de concentración entre el estado inicial y el tiempo t. (mM)

La derivada de la función f(t) es la expresión de la velocidad observada de consumo de sustrato por lo que la expresión para calcular la velocidad inicial observada de consumo de sustrato queda establecida como:

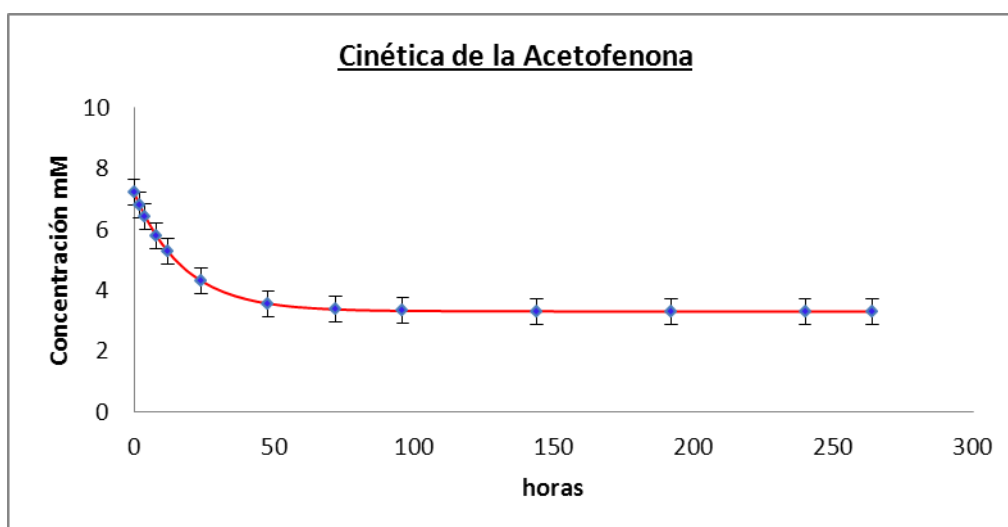
$$V_0 = -A \cdot K$$

De igual manera, cuando los niveles de producto cambian lentamente durante la reacción, los datos de velocidad observada pueden obtenerse recogiendo muestras de la mezcla de reacción a diferentes tiempos y analizando la variación de la concentración de producto. A modo de ejemplo se muestra en la Figura 02 el incremento de la concentración de producto 1-Feniletanol empleando *M. kaoliang* como biocatalizador.

**Tabla 03.** Resultados del análisis por HPLC del consumo de acetofenona con *D. grovesii*

Tiempo H	ACETOFENONA			Área Promedio	s	%CV	[mM] vial	[mM] matraz
	Area1	area2	area3					
0	1537.28000	1536.99889	1537.29876	1537.19255	0.168	0.01%	2.40	7.21
2	1449.38973	1449.36789	1450.00123	1449.58628	0.360	0.02%	2.27	6.80
4	1371.74578	1372.10023	1371.74806	1371.86469	0.204	0.01%	2.14	6.42
8	1238.45886	1239.20012	1238.45788	1238.70562	0.428	0.03%	1.93	5.79
12	1132.85038	1132.87569	1132.85043	1132.85883	0.015	0.00%	1.76	5.28
24	928.21452	928.22568	928.23618	928.22546	0.011	0.00%	1.44	4.31
48	772.30403	772.38762	772.34721	772.34629	0.042	0.01%	1.19	3.56
72	731.39665	732.78765	732.73635	732.30688	0.789	0.11%	1.12	3.37
96	722.18183	722.18765	722.19876	722.18941	0.009	0.00%	1.11	3.32
144	718.89793	718.89876	718.78965	718.86211	0.063	0.01%	1.10	3.31
192	718.68278	718.68753	718.69876	718.68969	0.008	0.00%	1.10	3.31
240	718.66356	718.67543	718.68546	718.67482	0.011	0.00%	1.10	3.31
264	718.66345	718.67876	718.98744	718.77655	0.183	0.03%	1.10	3.31

Pendiente: 628.77; ordenada: 25.344; muestra: 1500 uL; factor de dilución: 3.



**Fig. 01.** Cinética de consumo de Acetofenona 7,2 mM, a 28 °C y 250 rpm catalizada por *D. grovesii* (26 g de peso húmedo).

En la **Figura 02**, se puede observar que los resultados experimentales tienen una tendencia de crecimiento exponencial, razón por la cual todos los ensayos de obtención de producto para ambos microorganismos fueron ajustados con el programa EXFIT del paquete estadístico SIMFIT v5.5 ed. 18 a un modelo de crecimiento exponencial de la forma:

$$y(t) = B \cdot [1 - e^{-K \cdot t}]$$

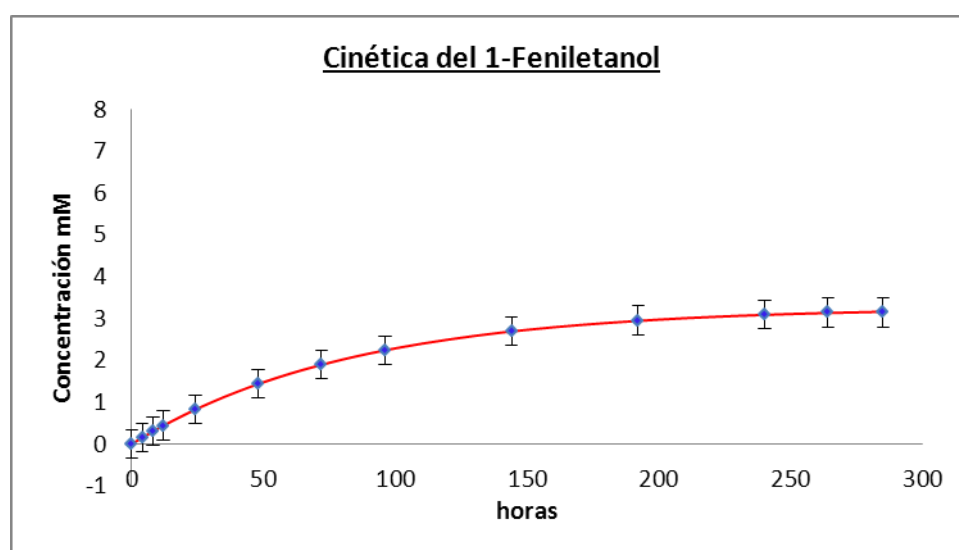
Donde:

K = Constante aparente de velocidad de aparición de producto. ( $h^{-1}$ )

B = Máxima concentración de producto alcanzada. (mM).

La derivada de la función  $y(t)$ ; según Fernandez, Lucas y Cols, 2008; es la expresión de la velocidad observada de aparición de producto de sustrato por lo que la expresión para calcular la velocidad inicial observada de consumo de sustrato queda establecida como:

$$V_o = B \cdot K$$



**Fig. 02.** Cinética de Formación del 1-feniletanol, a 28 °C y 250 rpm catalizada por *M. kaoliang* (26 g de peso húmedo).

### 3.3 Orden de Reacción

Se define como orden de reacción a la suma de los exponentes a los que van elevados las concentraciones de sustrato en la expresión cinética global y que suele indicar el número de moléculas implicadas en el paso limitante de la velocidad de reacción. En nuestro caso, sería "n" en la siguiente expresión:  $V = k [S]^n$ . Este parámetro se determina, o bien mediante el ajuste de los datos cinéticos a las ecuaciones integradas de velocidad o bien realizando experimentos con concentraciones múltiples de un valor. Se analizó la relación entre la velocidad inicial de reacción y la concentración inicial de sustrato para llevar a cabo la reducción de la acetofenona catalizada con células de *D. grovesii* y *M. kaoliang* en estado de no crecimiento a 200 rpm, pH = 6.5 y a T=30°C.

El análisis de datos cinéticos de la reacción test se realizó con el programa EXFIT del paquete SIMFIT v5.5, y en todos los casos se ajustaron con buena correlación ( $R^2$ ) al modelo de decaimiento exponencial descrito anteriormente; lo que indicaría que la reacción sigue una aparente cinética de primer orden. Los resultados de los experimentos realizados para la determinar el orden de reacción se muestran en la Tabla 04.

**Tabla 04.** Orden de la Reacción de Reducción de Acetofenona

Microorganismo	Cat g	Sustrato mM	Vo mM / h	Orden
<i>M. kaoliang</i>	8.4749	2.90	0.03	<b>1.2</b>
	9.5288	10.40	0.14	
<i>D. grovesii</i>	26.0890	7.47	0.22	<b>1.0</b>
	26.3571	18.70	0.55	

En la **Tabla 04** se puede observar que en cada uno de los experimentos realizados el orden de la reacción de reducción de la acetofenona es prácticamente de orden uno (pseudo primer orden), lo que justificaría el ajuste realizado de los datos experimentales según el modelo de la ecuación de primer orden. Cabe resaltar que se obtuvieron órdenes de reacción similares para otros compuestos carbonílicos según Quezada (2006), lo que confirmaría la veracidad del modelo utilizado. Asimismo, se puede observar que la velocidad inicial de reacción en cada uno de los experimentos realizados aumenta con el incremento de la concentración de sustrato manteniendo cantidades similares de biocatalizador. Para poder evaluar el efecto del biocatalizador en la cinética de la reacción de reducción de la acetofenona se procedió a determinar las constantes específicas de la reacción, como se indica a continuación.

### 3.4 Parámetros Cinéticos del sustrato acetofenona

En la Tabla 05, se muestran los principales parámetros cinéticos de la reacción de reducción de la acetofenona catalizada por *M. kaoliang* y *D. grovesii* en condiciones de no crecimiento. Los valores de las constantes A, K y C fueron obtenidos con el programa EXFIT del paquete informático SIMFIT v5.5 con buena correlación ( $R^2=0.999$ ).

**Tabla 05.** Parámetros cinéticos del Sustrato Acetofenon

ACETOFENONA							
Microorganismo	Cat g	Sustrato mM	A mM	K h <sup>-1</sup>	C mM	k <sub>esp</sub> h <sup>-1</sup> / gcat	Vo mM / h
<i>M. kaoliang</i>	8.4749	2.9	2.018	0.01452	0.878	0.0050	0.03
	9.5288	10.4	5.995	0.02291	4.386	0.0022	0.14
<i>D. grovesii</i>	26.0890	7.2	3.906	0.05678	3.308	0.0079	0.22
	26.3571	18.7	7.423	0.07427	10.510	0.0040	0.55



En la **Tabla 05** se puede observar que en cada uno de los dos experimentos realizados la constante específica de velocidad  $k_{esp}$  disminuye ligeramente con el incremento de la concentración inicial de sustrato manteniendo cantidades similares de biocatalizador, lo que puede deberse a que el incremento de la concentración de sustrato origina toxicidad a la célula causando inhibición de la enzima que cataliza el proceso de reducción, éstos resultados confirman las afirmaciones de Carballeira (2003) en cuanto a la toxicidad del sustrato originando la inhibición del biocatalizador por exceso de sustrato. Asimismo, podríamos afirmar que el valor de la constante específica del consumo de acetofenona es del orden de  $10^{-3}$  y que la acetofenona inhibe al biocatalizador a concentraciones superiores a 7.2 mM.

### 3.5 Parámetros Cinéticos del producto 1-feniletanol

En la Tabla 06, se muestran los principales parámetros cinéticos de la obtención del 1-feniletanol en la reacción catalizada por *M. kaoliang* y *D. grovesii* en condiciones de no crecimiento. Los valores de las constantes B y K fueron obtenidos con el programa EXFIT del paquete informático SIMFIT v5.5 con buena correlación ( $R^2=0.999$ ).

**Tabla 06.** Parámetros cinéticos del Producto de Reacción 1-Feniletanol

Microorganismo.	Cat g	Sustrato mM	1-FENILETANOL			
			B mM	K h <sup>-1</sup>	$k_{esp}$ h <sup>-1</sup> /gcat	Vo mM/h
<i>M. kaoliang</i>	8.4749	2.9	1.323	0.0039	0.00047	0.005
	9.5288	10.4	3.294	0.0039	0.00041	0.013
<i>D. grovesii</i>	26.0890	7.2	3.267	0.0120	0.00046	0.039
	26.3571	18.7	1.464	0.0105	0.00040	0.015

En la **Tabla 06** se puede observar que en el primer experimento realizado para la obtención del 1-Feniletanol la velocidad inicial de reacción aumenta con el incremento de la concentración de sustrato manteniendo cantidades similares de biocatalizador, mientras que la constante específica de velocidad no varía sustancialmente. En el segundo experimento se observa que la velocidad inicial de la reacción disminuye a medida que incrementa la concentración de sustrato, lo que podría deberse según Quezada 2006, a que el producto de reacción también inhiba la enzima que cataliza el proceso; mientras que la constante específica de velocidad no varía y mantiene el mismo valor que el primer experimento. Asimismo, podríamos afirmar que el valor de la constante específica de la obtención del 1-Feniletanol es del orden de  $10^{-4}$  y que la enzima se inhibe a concentraciones de sustrato superiores a 7.2 mM manteniendo casi constante la velocidad global de generación de 1-Feniletanol.

De la comparación de las Tablas 05 y 06, podemos afirmar que la velocidad específica de consumo del sustrato acetofenona es aproximadamente diez veces mayor que la velocidad específica de obtención del producto 1-feniletanol.

### 3.6 Productividad de la Biotransformación

En la Tabla 07 se muestran los resultados obtenidos de productividad a fin de evaluar la actividad específica de cada uno de los biocatalizadores en la reacción de reducción de la acetofenona.

En la Tabla 07 se puede observar que en cada uno de los experimentos realizados, la conversión y el rendimiento disminuyen al incrementar la concentración de sustrato, lo que reafirma cierto grado de toxicidad para la célula por parte del sustrato y producto de la reacción. Asimismo se puede observar que con el *M. kaoliang* a concentraciones bajas del sustrato acetofenona (2.9 mM) y con la *D. grovesii* a concentraciones altas de sustrato (18.7 mM) se obtienen bajas productividades por gramo de catalizador; mientras que a concentraciones moderadas de sustrato acetofenona (10.4 mM y 7.2 mM), las productividades mejoran sustancialmente. Estos resultados coinciden con lo expuesto por

Kurbanoglu (2011) en cuanto a que la diferencia porcentual entre la conversión y el rendimiento de la reacción hace suponer que la célula no sólo utiliza el sustrato acetofenona en la reacción sino que consume parte de él para su aprovechamiento en el incremento de la biomasa celular.

**Tabla 07.** Productividad del 1-Feniletanol

Microorganismo	Sustrato mM	cat g	Acetofenona		1-Feniletanol		P x 10 <sup>4</sup> mM / gcat . h
			X %	t h	Y %	T H	
<i>M. kaoliang</i>	2.9	8.4749	70	255	46	827	1.9
	10.4	9.5288	58	209	32	1068	3.2
<i>D. grovesii</i>	7.2	26.0890	54	77	45	347	3.6
	18.7	26.3571	44	67	8	322	1.7

X=conversión; Y=Rendimiento; t=tiempo; P=Productividad.

#### IV. CONCLUSIONES

El sustrato acetofenona fué satisfactoriamente biotransformado en 1-feniletanol, con buenas productividades al utilizar al *M. kaoliang* y *D. grovesii* en su fase estacionaria de su crecimiento (7 días), puesto que es el estado en que las células dejan de reproducirse y son metabólicamente más activas para la biosíntesis de metabolitos secundarios.

La cinética del proceso de reducción con *M. kaoliang* y *D. grovesii* es un proceso de pseudo-primer orden, con una velocidad específica de consumo del sustrato acetofenona aproximadamente diez veces mayor que la velocidad específica de obtención del producto 1-feniletanol. Al utilizar al microorganismo *Monascus kaoliang*, en sustrato de acetofenona a concentraciones alrededor de 10.4 mM permitió lograr una conversión de alrededor del 58% y una productividad de  $3.2 \times 10^{-4}$  mM/g cat\*h, mientras que la *Diplogelatinospora grovesii*, en sustrato acetofenona a concentraciones alrededor a 7.2 mM, permitió obtener una conversión de alrededor del 54% y una productividad de  $3.6 \times 10^{-4}$  mM/g cat\*h.

El proceso desarrollado en este trabajo es sostenible, ya que haciendo uso de células enteras de *M. kaoliang* y *D. grovesii* nos ha permitido llevar a cabo la reacción de reducción de la acetofenona en agua, a temperatura ambiente y presión atmosférica evitando así, así la utilización de disolventes orgánicos contaminantes y agentes reductores metálicos peligrosos.

#### AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Complutense de Madrid, por su contribución como entidad que financió el proyecto en su VI convocatoria de Cooperación al Desarrollo y al Parque Científico de Madrid por la capacitación recibida en el manejo de los equipos para el presente trabajo de investigación.

#### V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANASTAS, P., EGHBAI, N. 2010. **Green chemistry: principles and practice.** *Chem. Soc. Rev.*, 39(1), 301-312.
- ANASTAS, P.T., ABRAHAM M., MOENS, L. 2002. **Green chemistry as applied to solvents.** In. *Clean Solvents – Alternative Media for Chemical reactions and Processing*, Eds. Vol. 819, pp 1-9.

- ANASTAS, P. 2010. **Perspective on green chemistry: The most challenging synthetic transformation.** *Tetrahedron* 66(5), 1026-1027.
- ANASTAS, P., WARNER, J.C. 1998. **Green chemistry: theory and practice.** Oxford University Press: Oxford. USA
- BURKHARDT, E. R., MATOS, K. 2006. **Boron reagents in process chemistry: excellent tools for selective reductions.** *Chem Rev* 106(7), 2617-2650.
- CARBALLEIRA, J. D. 2003. **Nuevos microorganismos biocatalizadores para la reducción estereoselectiva de compuestos carbonílicos, oxidación de alcoholes y monoxidación de cetonas. Valoración cruzada HTS/QSAR-3D/CoMFA.** Tesis Doctoral. UCM. España.
- CARBALLEIRA, J.D., GARCÍA-BURGOS, C., QUEZADA, M. A., ALVAREZ, E., SINISTERRA, J. V. 2004. ***W. saturnus* and *Pachysolen tannophilus*: Novel microorganisms for stereoselective oxidation of secondary alcohols.** *Biotechnol. Bioeng.* 87(5):632-640.
- CURZONS, A. D., CONSTABLE, D. J. C., MORTIMER, D.N., CUNNINGHAM, V. L. 2001. **So you think your process is green, how do you know?. Using principles of sustainability to determine what is green. A corporate perspective.** *Green Chem* 3,1-6.
- DAVIES, I. W., WELCH, C. J. 2009. **Looking forward in pharmaceutical process chemistry.** *Science*, 325 (5941), 701-704.
- DOMÈNECH, X. 2005. **Química verde.** Rubens Editorial; 1era Edición.
- DRAUZ K., WALDMANN, H. 2002. **Enzyme catalysis in organic synthesis.** Wiley-VCH ; 2th Edition, pág 1559.
- FABER, K., KROUTIL, W. 2005. **New enzymes for biotransformations.** *Cur. Opin. Chem. Biol.* 9, 181-187.
- FABER, K. 2004. **Biotransformations in organic chemistry.** 5th Edition.
- FERNANDEZ-LUCAS, J., CONDEZO, L., QUEZADA, M. A., SINISTERRA, J. V. 2008. **Low-Temperature synthesis of 2-(deoxyadenosine using immobilized psychrotrophic microorganisms.** *Biotechnology & Bioengineering.* Vol. 100. N° 2.
- GRÖGER, H., BORCHERT, S., KRAUBER, M., HUMMEL, W. 2010. **Enzyme-catalyzed asymmetric reduction of ketones". In encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation and cell technology.** Flickinger, M. C., Ed. Jhon Wiley and sons. Inc.
- HIROAKI, Y. 2010. **Carbonil reductase in encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation and cell technology.** Flickinger, M. C., Ed. Jhon Wiley and sons. Inc.
- HOYOS, P., SANSOTTERA, G., FERNÁNDEZ, M., MOLINARI, F., SINISTERRA, J.V.,
- ALCÁNTARA, A.R. 2008. **Enantioselective monoreduction of different 1,2-diaryl-1,2-diketones catalyzed by lyophilized whole cells from *Pichia glucozyma*.** *Tetrahedron* 64 (34), 7929-7936.
- JENCK, J. F., AGTERBERG, F., DROESCHER, M. J. 2004. **Products and processes for sustainable chemical industry: a review of achievements and prospects.** *Green Chemistry* . 6, 544-556.
- ORGANIZASATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. 1998. **"Biotechnology for clean industrial products & process: towards industrial sustainability",** OECD publications, 2th Edition, 15-27

- KURBANOGU, E. B., SILBEYAZ, K., KURBANOGU, N. I. 2011. **Cryptococcus laurentii as a new biocatalyst for the asymmetric reduction of substituted acetophenones.** *Tetrahedron: Asymmetry*. 22, 345-350.
- MA, J. A., CAHARD, D. 2004. **Toward perfect catalytic asymmetric synthesis: dual activation of the electrophile and the nucleophile.** *Angew. Chem. Int. Edit.* 43(35), 4566-4583.
- MARTINES LAGOS, F., DEL CAMPO, C., LLAMA, E. F., SINISTERRA, J. V. 2000. **Preparation of halohydrine beta-blocker precursor using yeast catalysed reaction.** *Tetrahedron: Asymmetry*, 11, (23) 4651-4660.
- NAYORI, R. 2002. **Asymmetric catalysis: science and opportunities** (Nobel lecture). *Angew Chem. Int Edit*, 41(12), 2008-2022.
- NUÑEZ, M. C., GARCIA-RUBIÑO, M., CONEJO-GARCIA, A., CRUZ-LOPEZ, O., KIMATRAI, M., GALLO, M., ESPINOS, A., CAMPOS, J. 2009. **Homochiral drugs: A demanding tendency of the pharmaceutical industry.** *Curr. Med. Chem.* 16(16), 2064-2074.
- PARACHIN, N. S., CARLQUIST, M., GORWA-GRAUSLUND, M. F. 2010. **Bioreduction in encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology.** Flickinger, M.C., Ed. John Wiley and sons, Inc.
- PRESEECKI, A., FINDRIK, Z., ZELIAE, B. 2006. **Modeling of the biotransformation processes.** *Chem Biochem Eng* 20(3), 227-241.
- QUEZADA, M. A. 2006. **Reacciones estereoselectivas de reducción de cetonas y oxidación de alcoholes empleando células enteras inmovilizadas.** Tesis Doctoral. UCM. España.
- SHELDON, R. A. 2000. **Atom utilization, E factors and the catalytic solutions.** *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences – Series IIC – Chemistry* 3(7), 541-551.
- TUCKER, J.L. 2010. **Green chemistry: cresting and summit toward sustainability.** *Organic Process Research & Development* 14(2), 328-331.
- ZHANG, W., O'CONOR, K., WANG, D., LI, Z. 2009. **Bioreduction with efficient recycling of NADPH by coupled permeabilized microorganisms.** *Appl Environ Microbiol* 75(3), 687-694.